

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Utilização de culturas mistas como estratégia para estimular a
biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos**

Fernanda Oliveira das Chagas

Ribeirão Preto
2010

RESUMO

CHAGAS, F. O. **Utilização de culturas mistas como estratégia para estimular a biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos.** 2010. 140f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O estudo das interações planta-microrganismos tem sido de grande interesse ao longo dos últimos anos. Atualmente, as interações que ocorrem entre microrganismos que vivem em estreita relação também vêm merecendo grande atenção, pois forças competitivas e mutualísticas podem induzir a produção de novos metabólitos bioativos. Portanto, estudar interações existentes entre os microrganismos endofíticos que colonizam uma mesma planta parece ser uma estratégia promissora para a obtenção de substâncias quimicamente diferentes, eventualmente bioativas. Através da utilização de culturas mistas de microrganismos, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento da relação existente entre os fungos endofíticos SS13 (*Papulaspora immersa*), SS50 (*Fusarium oxysporum*), SS67 (*Nigrospora sphaerica*), SS77 (*Alternaria tenuissima*) e SS84 (*Phoma betae*), isolados da planta medicinal *Smallanthus sonchifolius* (yacon), e sua implicação no aumento da diversidade química de produtos naturais microbianos, com o intuito de se identificar metabólitos secundários anticancerígenos. Para isso, os fungos foram cultivados em culturas singles e mistas em meios de cultivo líquidos e semi-sólidos. Foram utilizados diferentes meios de cultura, diferentes maneiras de se estabelecer o cultivo misto e diferentes formas de extração. Os extratos foram analisados química e biologicamente. Após fracionamento, foram isoladas cinco substâncias: afidicolina (I), 3-desóxi-afidicolina (II), estenfiperilenol (III), alterperilenol (IV) e alternariol monometil éter (V), sendo as duas primeiras de origem terpênica e as outras de origem policetídis. As substâncias I e II foram produzidas pelo fungo SS67, sendo que a produção de I aparentemente aumentou nas culturas mistas líquidas com SS13 e SS84, diminuindo consideravelmente na cultura mista com SS77. Devido à afidicolina ser um composto altamente citotóxico, os cultivos do fungo SS67 originaram extratos muito ativos frente aos ensaios de citotoxicidade em células cancerígenas. A substância III, primeiramente, só foi detectada por CLAE-DAD na cultura mista dos fungos SS67 e SS77, e a produção da substância IV foi maior nessa cultura mista que na cultura simples do fungo SS77 (meio fermentativo de extrato de malte). Provavelmente esses compostos foram produzidos por SS77 em resposta à presença de SS67. O extrato obtido durante esse cultivo misto foi o que apresentou maior atividade citotóxica frente à linhagem celular MDAMB-435 (câncer de mama). Posteriormente, a substância III foi também isolada da cultura simples do fungo SS77 cultivado em outras condições (meio fermentativo PDB), juntamente com a substância V. Os experimentos de antagonismo em placa de Petri envolvendo esses dois fungos revelaram, ainda, a presença de vários outros compostos na zona de inibição, que não correspondem às substâncias previamente isoladas de meio líquido, e podem ser responsáveis pelo efeito antagônico observado em meio semi-sólido. Os experimentos de atividade antagônica dos metabólitos produzidos pelos fungos evidenciaram que muitos compostos ativos, provavelmente, são produzidos em quantidades ínfimas, o que impossibilita a detecção por CLAE-DAD. Além disso, verificou-se que a substância I não possui atividade antifúngica significativa contra os fungos SS13, SS50 e SS77 e que a inibição de SS67 por SS77 ocorre devido à produção de compostos difusíveis em meio semi-sólido, e ainda, muito provavelmente, pela produção da substância III e IV em meio líquido, além de outros policetídeos. A produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos deve ocorrer em consequência do papel ecológico que desempenham na natureza. Assim, a utilização de culturas mistas desses microrganismos deve induzir a produção de compostos que não seriam produzidos em condições não naturais.

Palavras-chave: fungos endofíticos, culturas microbianas mistas, policetídeos, *Nigrospora sphaerica*, *Alternaria tenuissima*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais como fontes de substâncias bioativas

Produtos naturais tiveram um importante papel no tratamento e prevenção de doenças humanas por milhares de anos (BAKER et al., 2007; CHIN et al., 2006). A natureza foi a fonte de agentes medicinais, e um enorme número de fármacos modernos são provenientes de fontes naturais, particularmente plantas, os quais tiveram seu uso, muitas vezes, baseado na medicina tradicional (CRAGG; NEWMAN, 2005). De fato, produtos naturais tiveram um papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos por um longo tempo (PUPO et al., 2006). Além disso, a complexidade estrutural dos produtos naturais inspirou químicos orgânicos sintéticos e também forneceu úteis ferramentas de pesquisa para a compreensão de muitas rotas bioquímicas (GALLO et al., 2008; GULLO et al., 2006).

Estudos clínicos, farmacológicos e químicos de medicamentos tradicionais, resultaram em fármacos como o anti-inflamatório aspirina (1), o cardiotônico digitoxina (2), o analgésico opióide morfina (3), o antimalárico quinina (4), além da pilocarpina, utilizada para tratamento de glaucoma (BUTLER, 2004) (Figura 1). A terapia anti-câncer também foi beneficiada pelos produtos naturais derivados de plantas como alcalóides da Vinca (5 e 6) e paclitaxel (7), assim como por derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, como etoposídeo e teniposídeo, e derivados de camptotecina, como topotecam e irinotecam (CALLERY, 2002) (Figura 1).

A busca por compostos produzidos por microrganismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de planta. A descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. Esta descoberta levou pesquisadores acadêmicos e de companhias farmacêuticas a procurar intensivamente produtos bioativos derivados de microrganismos, e esta busca produtiva resultou em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (GALLO et al., 2008).

É importante ressaltar que os produtos naturais representam a principal fonte de agentes terapêuticos inovativos para doenças infecciosas (bacterianas e fúngicas), câncer, desordens lipídicas e imunomodulação (CLARDY; WALSH, 2004; GULLO et al., 2006).

Uma análise da origem dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2006 mostra que produtos naturais ou substâncias derivadas de produtos naturais (com modificação semi-sintética) compreendem 34% de todas pequenas moléculas consideradas novas entidades químicas. Além disso, 29% dessas novas entidades são miméticos de compostos naturais ou foram sintetizadas com base no estudo de grupos farmacofóricos relacionados aos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Entre 2005 e 2007, 13 fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados, sendo que 5 deles representam o primeiro membro de uma nova classe de fármacos: os peptídeos exenatídeo e ziconotídeo, e as pequenas moléculas ixabepilona, retapamulina e trabectedina (BUTLER, 2008). Fármacos recentemente aprovados, baseados em produtos naturais, têm sido extensivamente descritos. Estes incluem compostos de plantas, como o agente anticâncer elliptinium, e galantamina e huperzina, utilizados no tratamento de doença de Alzheimer; derivados de microrganismos, como o antibiótico daptomicina; e de animais, como exenatídeo para tratamento de diabetes mellitus tipo 2 e o analgésico ziconotídeo; assim como compostos sintéticos e semi-sintéticos baseados em produtos naturais, como os antibióticos tigeciclina e telitromicina, o imunossupressor everolimus, e os antifúngicos micafungina e caspofungina. Essas substâncias, além de abrangerem uma variedade de indicações terapêuticas, apresentam ampla diversidade estrutural (HARVEY, 2008).

Várias razões têm sido apresentadas para explicar os sucesso dos produtos naturais na descoberta de fármacos, dentre elas, a grande diversidade química, os efeitos da pressão evolutiva na criação de moléculas biologicamente ativas, a similaridade estrutural de alvos protéicos nas diferentes espécies etc (HARVEY, 2007; KNIGHT et al., 2003). Nem todas as explicações sugeridas podem ser facilmente evidenciadas, entretanto, a análise comparativa entre a diversidade estrutural de produtos naturais e de compostos sintéticos comprova a maior variedade de produtos naturais, além da maior similaridade ao espaço químico ocupado por fármacos (HARVEY, 2007).

Assim, a indiscutível diversidade química e propriedades *drug-like* dos produtos naturais, associada ao grande número de compostos derivados de fontes naturais já aprovados para uso na terapêutica, evidenciam que produtos naturais

são uma importante fonte de estruturas líderes no processo de desenvolvimento de fármacos.

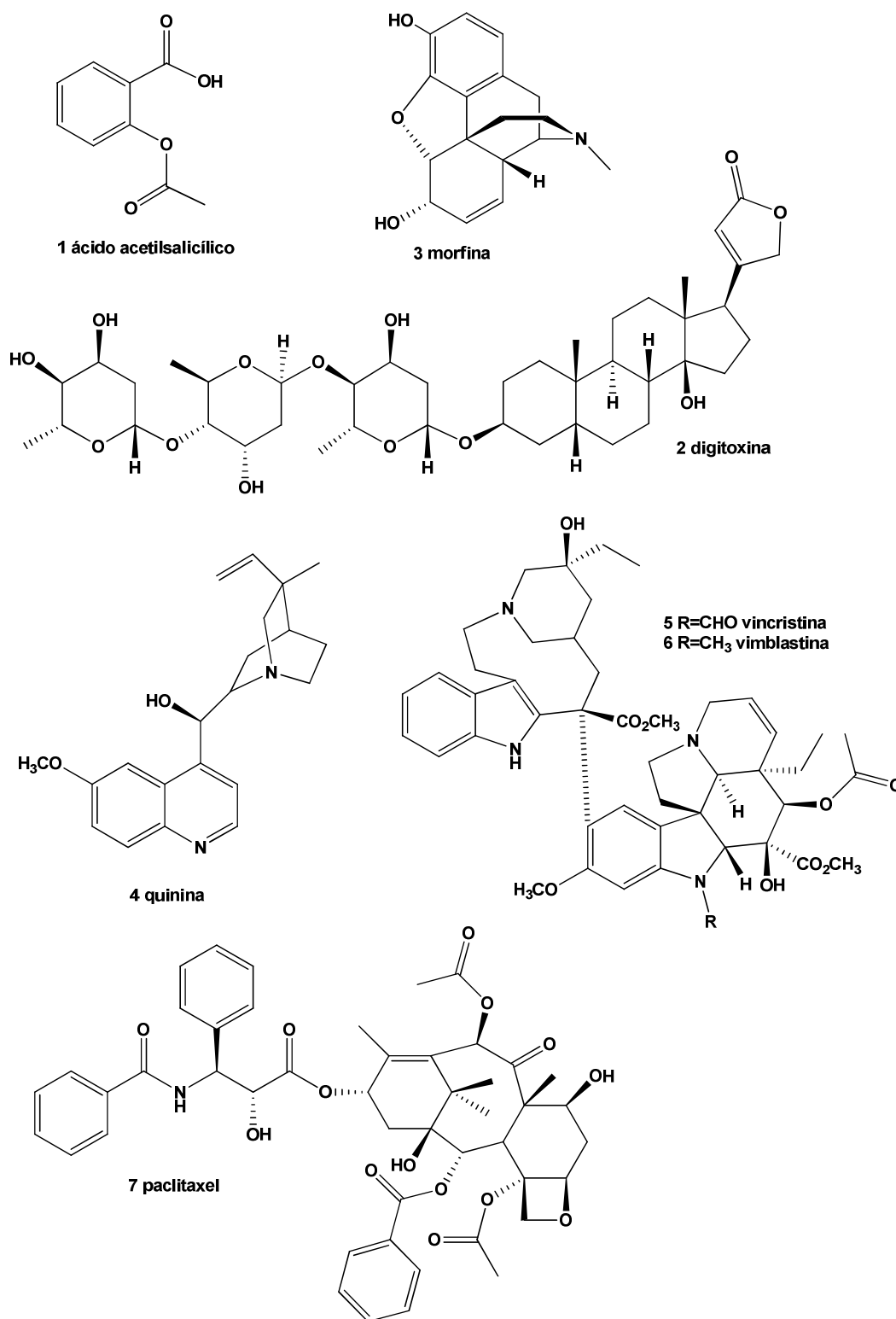


Figura 1. Produtos naturais derivados de plantas utilizados na terapêutica.

1.2 Produtos naturais derivados de microrganismos

Produtos naturais microbianos representam uma apreciável fonte de estruturas químicas únicas que têm sido otimizadas durante a evolução e produzidas por comunicação e em resposta a mudanças no habitat microbiano, incluindo estresse ambiental (GUNATILAKA, 2006). Assim, esse compostos possuem importante papel no processo de descoberta de fármacos (GROSS, 2009; GUNATILAKA, 2006; HERTWECK, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Dentre os fármacos de origem microbiana, estão os anti-bacterianos penicilinas (8), cefalosporinas (9), ácido clavulânico (10), carbapeninas e monobactamas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas e peptídeos cíclicos; os utilizados na terapia anti-câncer, como bleomicinas, actinomicina D, mitomicina C (11), antraciclina e pentostatina (12); e os imunomoduladores ciclosporina A, rapamicina (13), tacrolimus, ascomicina (14) e ácido micofenólico. Entretanto, entre os mais interessantes produtos naturais microbianos já descobertos estão os agentes redutores de colesterol derivados de fungos. Esses fármacos anti-hiperlipidêmicos, conhecidos como estatinas, estão entre os mais vendidos no mundo, e incluem mevastatina (15) e lovastatina (16) de origem natural, e análogos sintéticos, como atorvastatina e sinvastatina (PUPO et al., 2006) (Figura 2).

Apesar das importantes substâncias biologicamente ativas utilizadas na terapêutica, os fungos e bactérias constituem um dos grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (STROBEL et al., 1996). Historicamente, de todos os microrganismos estudados, actinobactérias e fungos têm sido reconhecidos como os mais prolíficos produtores de metabólitos secundários (GUNATILAKA, 2006).

Entretanto, a alta taxa de redescoberta de metabólitos secundários é um problema crônico na química de produtos naturais, evidenciando que novas abordagens são necessárias para aumentar a probabilidade de encontrar estruturas bioativas inéditas (GROSS, 2009; OH, 2007; SCHERLACH; HERTWECK, 2009; ZERIKLY; CHALLIS, 2009).

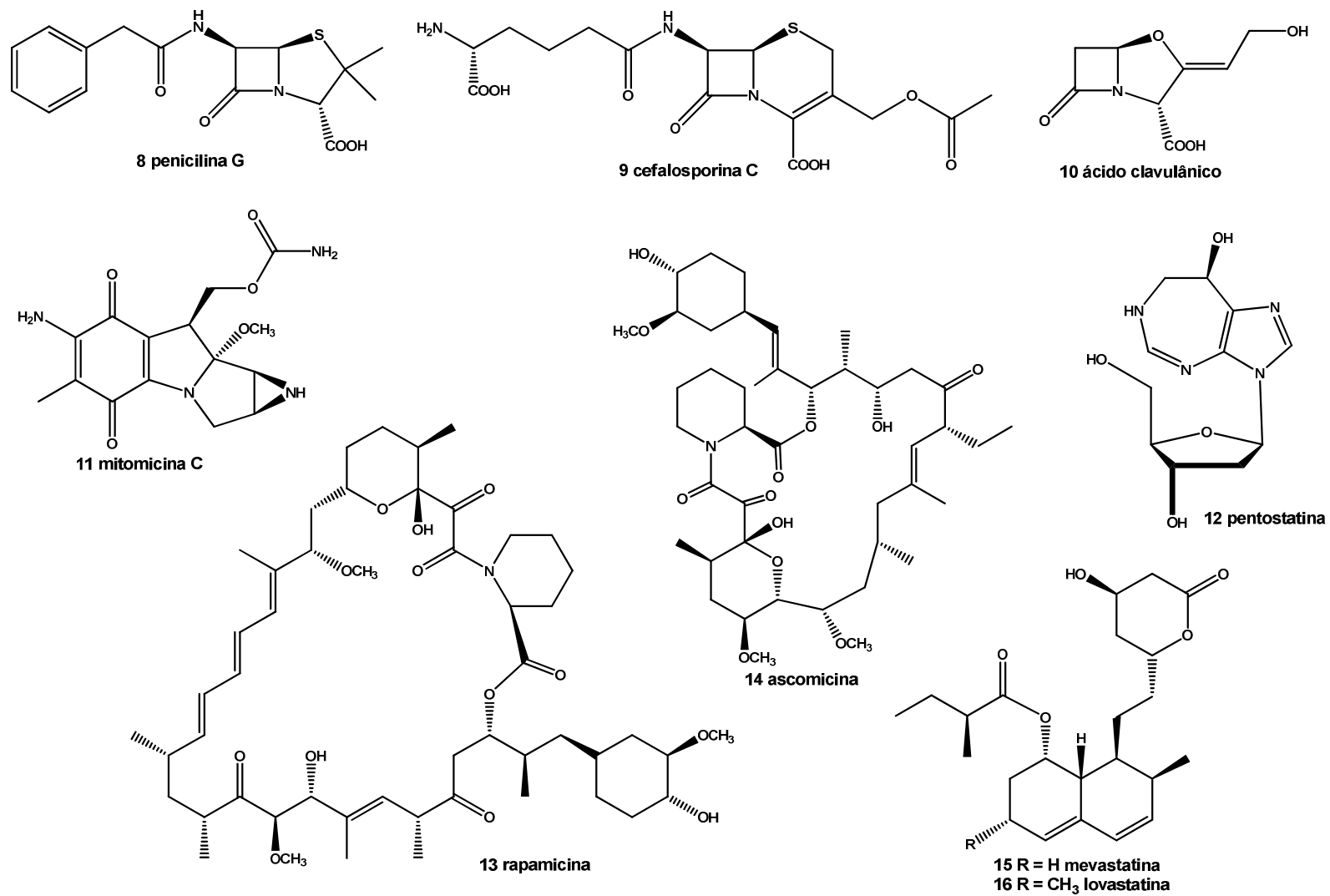


Figura 2. Produtos naturais de origem microbiana utilizados na terapêutica.

Avanços no entendimento da biossíntese de produtos naturais em nível genômico têm mostrado que a maioria dos *clusters* de genes para biossíntese de produtos naturais microbianos não são expressos em condições de cultivos usuais, na ausência de um estímulo particular (HERTWECK, 2009). Assim, a utilização de culturas microbianas mistas representa uma metodologia alternativa para racionalmente induzir a expressão de rotas biossintéticas de produtos naturais. Além disso, para aumentar as chances de sucesso na descoberta de novas substâncias bioativas, novos nichos de biodiversidade devem ser investigados (CLARDY; WALSH,

1.3 Fungos endofíticos

A simbiose entre fungo e planta é um fenômeno bem conhecido na natureza, e possui um importante papel nas comunidades de plantas, afetando a colonização, competição, coexistência e dinâmica dos nutrientes no solo (CLAY; HOLAH, 1999; LEMONS et al., 2005; PYROZYNSKI; HAWKSWORTHY, 1988). A maioria, senão todas as plantas estudadas no seu ecossistema natural, estão infestadas por fungos sem nenhuma manifestação de doenças. Por definição, estes fungos são conhecidos como endofíticos e ocorrem em grande diversidade no interior de seus hospedeiros (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006).

O termo endofítico tem provocado controvérsia desde o seu aparecimento (PETRINI, 1991) e há vários relatos de que endofíticos podem se tornar parasitas sob determinadas condições (SCHULZ; BOYLE, 2005). Entretanto, uma variedade de estudos ainda é baseada no convencional conhecimento de que fungos endofíticos são defensores mutualísticos das plantas (GRAYER; KOKUBUN, 2001; SALMINEN et al., 2005).

A relação fungo endofítico-planta hospedeira é caracterizada pelo equilíbrio entre a virulência fúngica e a defesa da planta. Esse equilíbrio é dinâmico e pode ser alterado sob condições de estresse do hospedeiro ou por mudanças fisiológicas em algum dos organismos envolvidos. Perturbações nesse balanço podem resultar no desenvolvimento de doença (SCHULZ et al., 2002).

Como benefício da associação, o fungo endofítico recebe nutrição e abrigo da planta hospedeira, aumentando sua sobrevivência (MÜLLER; KRAUSS, 2005; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004) e garantindo sua disseminação à

próxima geração do hospedeiro, através de transmissão vertical (FAETH; FAGAN, 2002; MULLER; KRAUSS, 2005). Da mesma forma, a planta aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência frente a fatores bióticos (CLAY; SCHARDL, 2002) e abióticos (SAIKKONEN et al., 1998; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004).

O mecanismo pelo qual o fungo beneficia e aumenta o desempenho do seu hospedeiro é através da excreção de metabólitos (SCHULZ et al., 1995). Tais substâncias podem ser importantes para várias interações metabólicas entre o fungo e a planta, incluindo sinalização, defesa e regulação da relação simbiótica (SCHULZ; BOYLE, 2005). Dessa maneira, a interação metabólica de um endofítico com seu hospedeiro pode favorecer a biossíntese de uma variedade de produtos naturais bioativos (BORGES et al., 2009).

Estudos têm mostrado que essa hipótese é possível, já que um significativo número de substâncias inéditas e bioativas têm sido isoladas desses microrganismos (**17 – 23**) (BORGES et al., 2009; GUNATILAKA, 2006; GUO et al., 2008) (Figura 3).

Como resultado dessa estreita relação, há possibilidade de que alguns microrganismos endofíticos tenham sistemas genéticos que permitam a transferência de informações entre eles próprios e a planta hospedeira (GALLO et al., 2008). Como consequência, os microrganismos associados podem regular rotas bioquímicas, levando à produção de substâncias comuns a seus hospedeiros ou vice-versa, que podem ter aplicações fora da planta na qual eles residem (STROBEL, 2002). Essa hipótese é embasada na constatação da produção de determinados compostos, incluindo substâncias terapeuticamente relevantes, como taxol (**24**) (STIERLE et al., 1993; STROBEL, 2002; STROBEL et al., 2004; TAN; ZOU, 2001), vincristina (**25**) (YANG et al., 2004; ZHANG et al., 2000), podofilotoxina (**26**) (EYBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2006; PURI et al., 2006) e camptotecina (**27**) (PURI et al., 2005) por endofíticos associados à planta originalmente produtora (Figura 4).

É notável a grande diversidade de metabólitos secundários, sintetizados via várias rotas metabólicas diferentes, que tem sido isolada de fungos endofíticos. A proporção de estruturas inéditas e extratos biologicamente ativos produzidos por endofíticos é consideravelmente superior à quantidade produzida por microrganismos de solo. Isso se deve ao fato de que a síntese de compostos

biologicamente ativos pode ser favorecida pela interação simbiônica, e ainda, que esse grupo de organismos não tem sido extensivamente estudado (SCHULZ et al., 2002). Assim, é possível esperar substâncias estruturalmente inéditas e biologicamente relevantes a partir de microrganismos endofíticos.

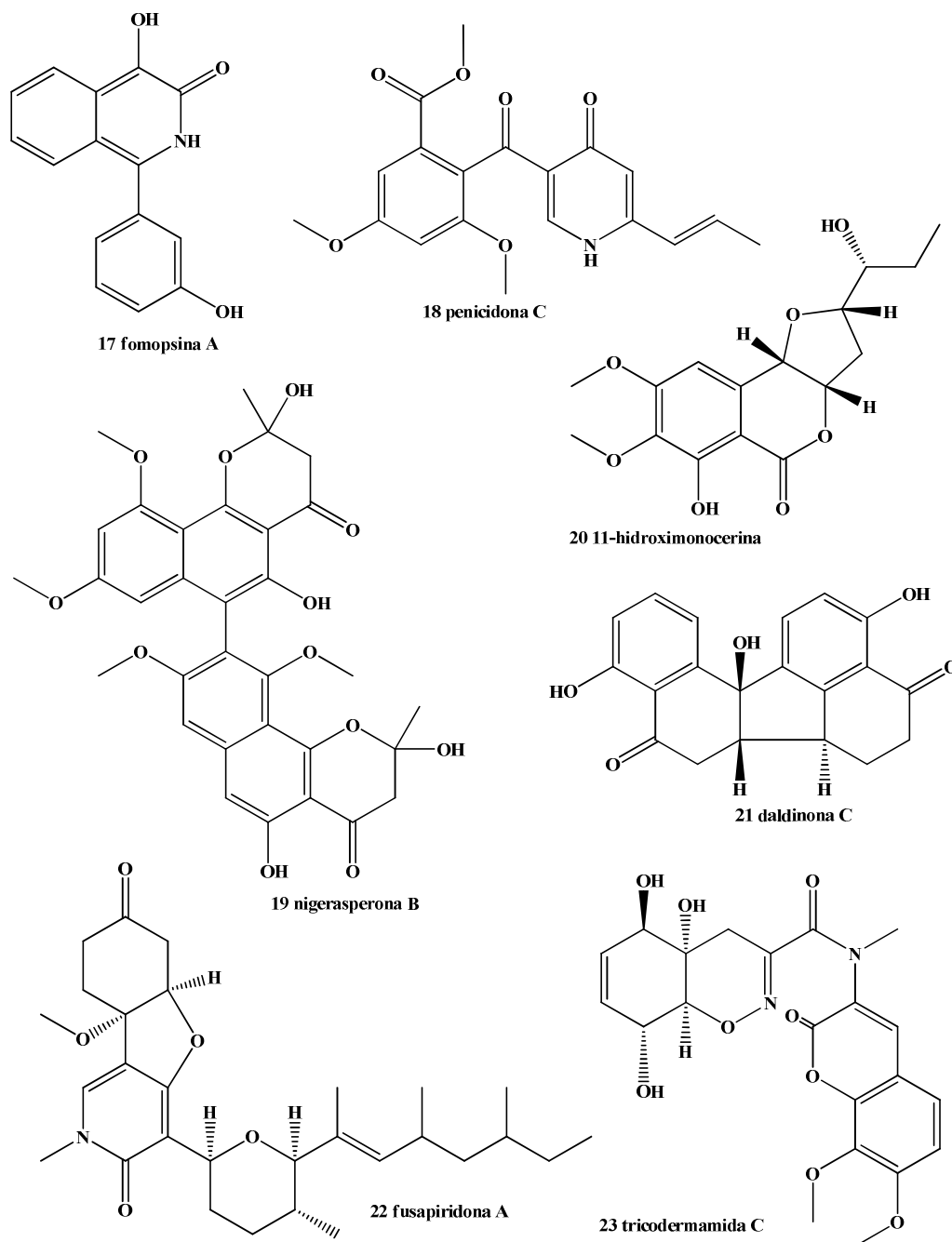


Figura 3. Substâncias inéditas e bioativas isoladas de microrganismos endofíticos.

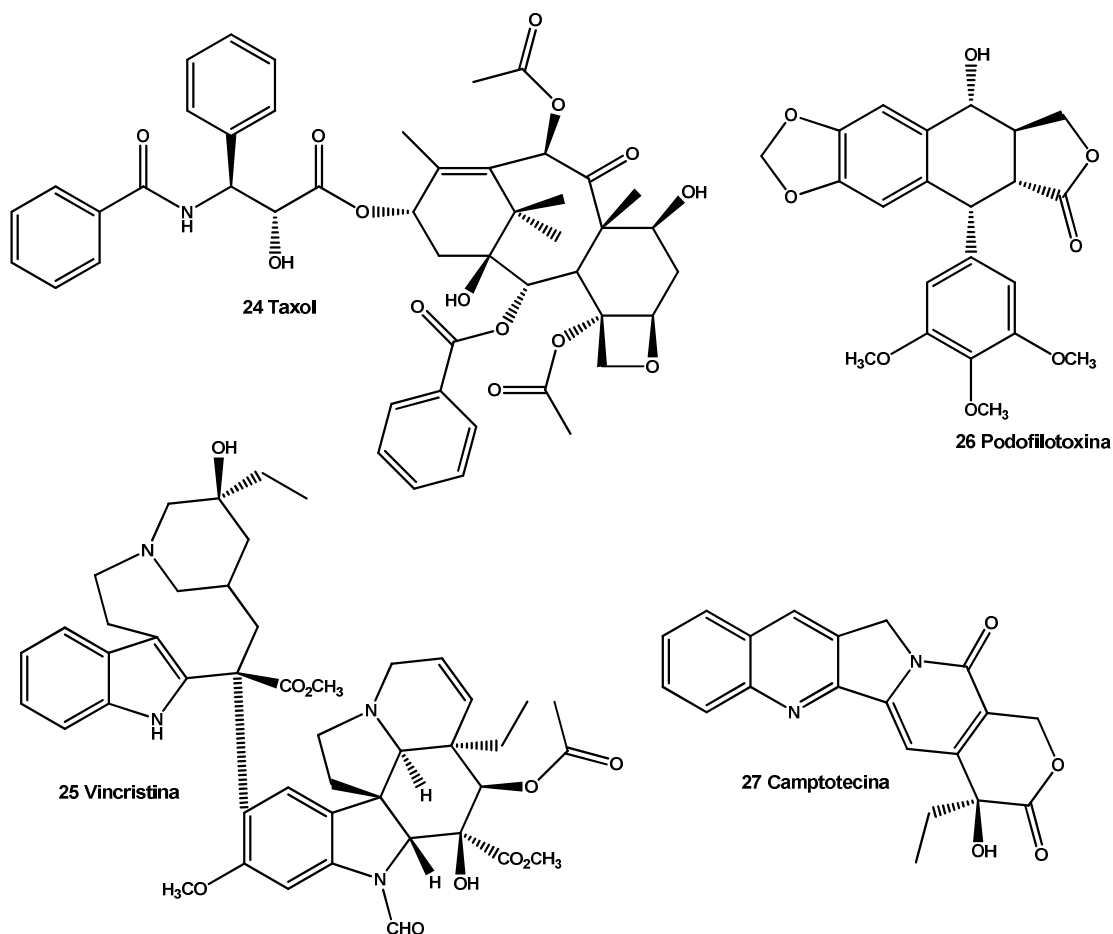


Figura 4. Substâncias em comum produzidas por microrganismos endofíticos e sua planta hospedeira.

1.4 Interações microbianas e culturas mistas

No habitat natural, os microrganismos estão em constante interação, principalmente em áreas amplamente colonizadas. Sobreviver em um ambiente competitivo provavelmente requer estratégias, tais como a produção de metabólitos secundários bioativos (KNIGHT et al., 2003; SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001). Assim, grupos de genes potencialmente interessantes, responsáveis pela expressão de metabólitos que aumentam a competitividade no meio ambiente, podem estar silenciados nas condições não naturais de cultivo (PETTIT, 2009).

Uma estratégia utilizada para mimetizar o ambiente microbiológico natural é cultivar um microrganismo em presença de outro. Em estudos prévios, a utilização de culturas mistas resultou em aumento da atividade antibiótica de extratos brutos

(SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001); aumento no rendimento de metabólitos já descritos (ANGELL et al., 2006; OH et al., 2007; SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001), assim como de metabólitos previamente não detectados (OH et al., 2005; PARK et al., 2009; ZHU et al., 2007; ZHU; LIN, 2006); em análogos de metabólitos conhecidos, resultantes da combinação de diferentes rotas biossintéticas (DEGENKOLB et al., 2002; KUROSAWA et al., 2008); e indução de rotas não expressas, que levaram à produção de substâncias bioativas (CUETO et al., 2001).

Evidências de que culturas mistas microbianas podem induzir a produção novas moléculas biologicamente relevantes foram encontradas em experimentos em que fungos e bactérias originários de minas drenadas foram cultivados juntos. Somente em co-cultura com a linhagem bacteriana *Sphingomonas* sp., o fungo *Aspergillus fumigatus* foi capaz de produzir glionitrina A (**28**) (Figura 5), uma nova dicetopiperazina bissulfeto, com atividade antibiótica e citotóxica. Além disso, verificou-se que a produção depende da constante interação competitiva entre os microrganismos e envolve mecanismos ainda desconhecidos (PARK et al., 2009).

A biossíntese do antibiótico pestalona (**29**) (Figura 5) pelo fungo *Pestalotia* sp., derivado da alga parda *Rosenvingea* sp., é um exemplo de indução da expressão de uma rota biossintética em resposta a co-cultura com bactéria marinha unicelular não identificada. Pestalona não foi produzida quando fungos e bactérias foram cultivados individualmente, indicando que sua produção é induzida pela competição. Foi sugerido que a biossíntese não é regulada por substâncias produzidas pela bactéria, e ainda, que não ocorre pela transformação fúngica de um metabólito bacteriano (CUETO et al., 2001).

Os diterpenos libertelenonas A-D (**30–33**) (Figura 5) também foram produzidos em resposta às interações microbianas na co-cultura entre o fungo *Libertella* sp., isolado de uma ascídia, e uma bactéria marinha unicelular. Após vários experimentos, verificou-se que a indução é controlada por interações célula-célula e não por sinalização molecular (OH et al., 2005). Curiosamente, a linhagem bacteriana capaz de induzir a biossíntese das libertelenonas é a mesma que induziu a produção de pestalona nos estudos previamente mencionados.

O co-cultivo envolvendo o fungo *Emericella* sp., isolado de alga verde do gênero *Halimeda*, e a actinobactéria marinha *Salinispora arenicola* levou ao isolamento de dois novos depsipeptídeos cíclicos antimicrobianos, emericelamidas A

e B (34–35) (Figura 5). Esses compostos são produzidos em baixíssimas quantidades na cultura simples do fungo, o que poderia dificultar seu isolamento e elucidação estrutural. Em co-cultura, no entanto, os rendimentos foram ampliados em 100 vezes (OH et al., 2007). Similarmente, aumento na produção do antibiótico istamicina pela bactéria marinha *Streptomyces tenjimariensis* também foi relatado em culturas mistas com diferentes linhagens de bactéria unicelular marinha (SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001).

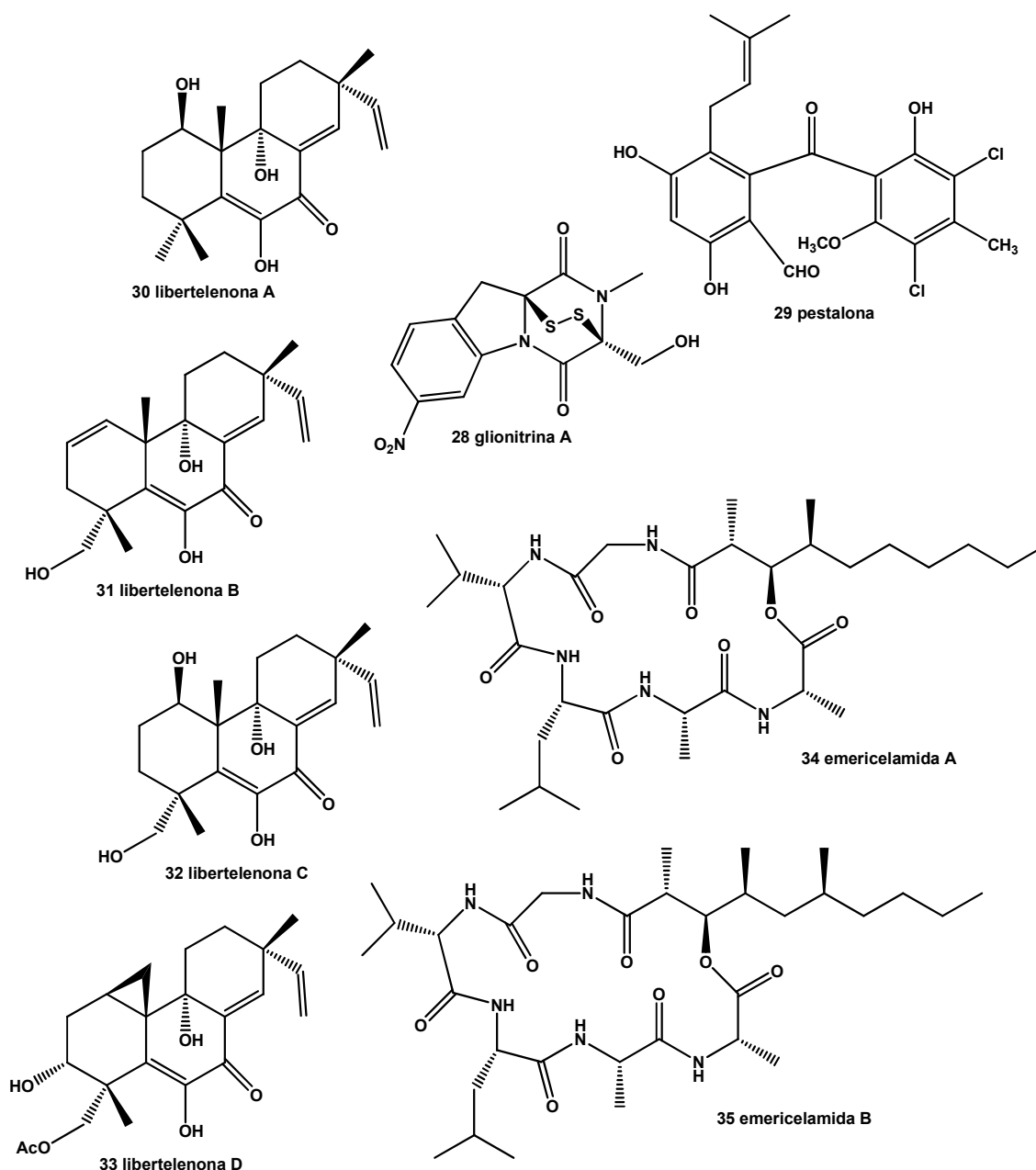


Figura 5. Substâncias inéditas e biologicamente ativas isoladas de culturas mistas microbianas.

Durante o co-cultivo de *Acremonium* sp. e *Mycogone rosea*, foi observada a formação de novos lipoaminopeptídeos, acremostatinas A-C. Supostamente, ambos microrganismos estão diretamente envolvidos na biossíntese desses compostos, sendo que o núcleo peptídico provém de *Acremonium* sp. enquanto que a porção de origem lipídica é oriunda de *M. rosea* (DEGENKOLB et al., 2002).

Novos antibióticos aminoglicosídeos foram produzidos por *Rhodococcus fascians* quando co-cultivado com *Streptomyces padanus*. Rodostreptomina A e B não foram detectadas nas culturas simples das respectivas bactérias, e ambos compostos apresentam amplo espectro de ação antibacteriana. Possivelmente, a biossíntese foi resultante de rotas biossintéticas combinadas dos diferentes microrganismos, pois existe uma correlação entre a produção desses compostos e a presença de DNA de *S. padanus* em *R. fascians* (KUROSAWA et al., 2008).

O co-cultivo de *Aspergillus giganteus* com vários microrganismos alterou a expressão do gene *afp*, responsável pela produção de uma proteína antifúngica. A presença de *Fusarium oxysporum* induziu a transcrição, enquanto que a cultura mista com *Aspergillus niger* resultou em supressão da transcrição desse gene. Os experimentos ainda revelaram que a influência do cultivo misto foi extremamente dependente da composição do meio (MEYER; STAHL, 2003).

A partir de uma mistura de microrganismos originários de sedimentos marinhos, foi isolada a piocianina, um pigmento azul com atividade antibiótica. Para determinar qual microrganismo era responsável pela produção, as bactérias foram isoladas. No entanto, o pigmento não foi detectado em culturas puras, indicando que é necessária a interação microbiana para que ocorra a biossíntese. Após investigações, foram identificadas as bactérias produtora e indutora, sendo, respectivamente *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.. Verificou-se, ainda, que a produção de pequenas moléculas pela linhagem indutora não é suficiente para ativar a produção do composto pela produtora, sugerindo que a indução necessita de contato célula-célula, ou mecanismos mais complexos, como a constante troca de metabólitos entre os microrganismos. Como ambas bactérias apresentam resistência ao antibiótico, sua produção pode oferecer-lhes vantagem competitiva frente às bactérias sensíveis (ANGELL et al., 2006).

Estudos envolvendo a mixobactéria *Chondromyces crocatus*, que na maioria das vezes é encontrada associada com a bactéria *Candidatus comitans*, evidenciam

a importância de se trabalhar com culturas mistas. O isolamento das linhagens associadas as tornam inviáveis, e por essa razão, a maioria dos experimentos são realizados com as linhagens que são encontradas não associadas. Entretanto, trabalhar com culturas mistas, provavelmente, resultaria na obtenção de compostos adicionais que não são produzidos pelas linhagens não associadas (BODE, 2006). Um importante exemplo de associação simbiótica ocorre entre a bactéria *Burkholderia* sp. e o fungo *Rhizopus* sp.. Durante muito tempo esse fungo foi considerado o produtor de rizoxina, o composto causador da podridão do arroz. No entanto, foi verificado que, na verdade, é a bactéria endossimbionte que é responsável pela biossíntese dessa substância (PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2005).

Interações mais complexas podem ser observadas em formigas *Apterostigma dentigerum* que se envolvem em associações mutualísticas com os fungos que elas cultivam para se alimentar e com a actinobactéria *Pseudonocardia* spp., que produz antibióticos para defender o fungo cultivado de fungos parasitas. Uma análise desse sistema em nível molecular revelou que as bactérias associadas produzem dentigeromicina, um depsipeptídeo com aminoácidos altamente modificados, que inibe seletivamente o fungo parasita *Escovopsis* sp., também encontrado nessas formigas (OH et al., 2009).

Em experimentos de culturas mistas microbianas, também foi observado aumento da produção de toxinas e inibição no desenvolvimento dos microrganismos (SÁNCHEZ et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007; CHAURASIA et al., 2005). Quando *Fusarium proliferatum* foi cultivado em presença de *Trichoderma* spp., ocorreu acentuada diminuição da produção da toxina fumonisina B1 por *F. proliferatum* (ROJO et al., 2007). Em culturas mistas, *Trichoderma harzianum* foi capaz de inibir o desenvolvimento de patógenos de solo e plantas (CHOUDARY; REDDY; REDDY, 2007; GAO et al., 2001).

Experimentos mostraram que a produção de ocratoxina A, uma micotoxina produzida por espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, foi inibida quando *Aspergillus carbonarius* cresceu em culturas mistas (VALERO et al., 2006). Em contraste, outros relatos indicam que, em culturas mistas, a produção foi significativamente estimulada (LEE; MANGAN, 1999). Além disso, houve aumento na produção da toxina esterigmatocistina pelo fungo *Aspergillus versicolor* quando este foi cultivado com *Penicillium aurantiogriseum* ou *Aspergillus parasiticus*

(BOKHARI; FLANNIGAN, 1996). A produção de estrobilurina A ou X por *Oudemansiella mucida* também foi estimulada na presença de *Penicillium notatum*, que em resposta produziu crisogina (KETTERING et al., 2004). Em contraste, a produção de micotoxinas por contaminantes de queijo foi inibida pelo fungo *Geotrichum candidum* (NIELSEN et al., 1998).

Em culturas de *Heterobasidion annosum*, *Gloeophyllum abietinum* ou *Armillaria ostoyae*, a biossíntese de alguns metabólitos secundários tóxicos foi aumentada em 400 vezes na presença de um antagonista (SONNENBICHLER et al., 1994). Entretanto, outros experimentos revelaram que as toxinas fammanoxina de *H. annosum* e oosponol de *G. abietinum* foram detoxificadas por fungos antagônicos (SONNENBICHLER et al., 1993).

Em cultura mista, o fungo *Coniothyrium minitans*, aparentemente, é capaz de degradar o ácido oxálico produzido por *Sclerotinia sclerotiorum*, prevenindo o efeito danoso dessa substância na atividade de sua enzima β -1,3-glucanase (REN et al., 2007).

A produção de enzimas também pode estar diretamente envolvida na interação e competição entre os microrganismos. Em culturas mistas, microrganismos produzem enzimas como proteases, β -1,3-glucanases e quitinases que podem ser responsáveis pela degradação das paredes celulares das hifas dos microrganismos competidores (SÁNCHEZ et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007; GUTHRIE; CASTLE, 2006), e atuarem como fatores indutores da produção de metabólitos secundários (SHIN et al., 1998). As enzimas fenol-oxidases tais como lacase e peroxidase também são conhecidas por estarem envolvidas em processos de degradação. Adicionalmente, elas participam da detoxificação de compostos xenobióticos como antifúngicos (TSUJIYAMA; MINAMI, 2005).

A partir das pesquisas realizadas, nota-se que ainda não está claro como as interações entre várias espécies induzem a produção de metabólitos secundários, já que fatores indutores podem variar desde enzimas (SHIN et al., 1998) até células viáveis (OH et al., 2005). No entanto, o isolamento de várias substâncias inéditas com atividade biológica (PARK et al., 2009; OH et al., 2007; ZHU; LIN, 2006; OH et al., 2005; CUETO et al., 2001, DEGENKOLB et al., 2002; KUROSAWA et al., 2008) evidenciam que o cultivo misto representa uma estratégia promissora na indução da expressão do potencial metabólico total de cada microrganismo, culminando em aumento da diversidade química.

Apesar do relativo conhecimento sobre a relação simbiótica existente entre microrganismos endofíticos e sua planta hospedeira, que resulta na produção de compostos bioativos e metabólitos idênticos aos produzidos pelas plantas hospedeiras (BORGES et al., 2009; GUNATILAKA, 2006), pouco é conhecido a respeito das relações existentes entre os endofíticos que colonizam uma mesma planta. Sabe-se que o número de linhagens de endofíticos encontradas dentro dos tecidos de uma planta pode variar, chegando a centenas por planta (KNIGHT et al., 2003). Considerando que a competição microbiológica por espaço limitado e nutrientes é a maior força ecológica que rege a produção de metabólitos secundários bioativos (BROCK, 1966; ALEXANDER, 1971), devem existir interações entre esses microrganismos que possuam um papel fundamental na produção de substâncias biologicamente ativas. Até o momento, há relatos de uma única cultura mista envolvendo fungos endofíticos marinhos (não identificados), que levou à produção de novos análogos de 1-isoquinolona, marinamida (**36**) e seu éster metílico (**37**) (Figura 6) (ZHU; LIN, 2006), além da produção de dicetopiperazinas ciclo-(phe-phe) e do ácido 6-metil-salicílico (ZHU et al., 2007), que não foram produzidos quando os fungos foram cultivados individualmente.

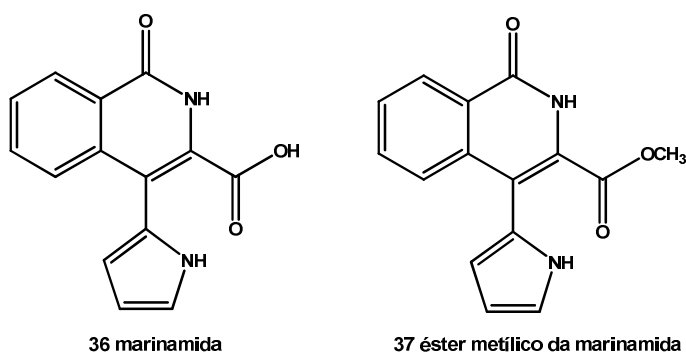


Figura 6. Substâncias inéditas produzidas por fungos endofíticos cultivados em culturas mistas.

Certamente, o estudo das culturas mistas de endofíticos, além de possibilitar a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas, representa uma oportunidade de compreender as interações entre os microrganismos endofíticos, e sua relação com a planta hospedeira, em nível molecular.

5 CONCLUSÕES

Através dos experimentos foi possível perceber que as condições ideais de cultivo, em meio líquido, visando a produção de metabólitos ativos, variam de um fungo para outro. Variações no meio de cultura e aeração influenciaram de forma significativa a produção de metabólitos secundários por resultar em variações na capacidade de desenvolvimento de cada fungo, ou simplesmente, por causar alterações no seu perfil metabólico. Além disso, a forma de extração é um fator importante na obtenção das substâncias de interesse, pois pode favorecer a extração de alguns metabólitos em detrimento de outros. Assim, a extração utilizando dois processos diferentes parece ser a melhor alternativa para obter extratos mais complexos e em maiores rendimentos.

Em relação ao método utilizado para se estabelecer as culturas mistas líquidas, pôde-se concluir, através da análise química, que a maior diversificação na produção de metabólitos foi obtida com a adição simultânea dos diferentes fungos na cultura fermentativa. Quando foi feita a adição não simultânea, o pré-estabelecimento de um dos fungos resultou em inibição do desenvolvimento do outro, e conseqüentemente, limitada produção de metabólitos secundários pela linhagem adicionada posteriormente. Além disso, com a utilização deste segundo método, não foi observado aumento na produção de nenhum composto pela cultura mista, indicando que a adição tardia do fungo concorrente, em pequenas quantidades, não foi capaz de induzir uma resposta antagônica detectável.

Durante as culturas mistas líquidas envolvendo o fungo SS67, a produção de afidicolina (substância I) foi alterada, havendo relativo aumento no cultivo com SS13 e SS84, o que indica que a presença desses fungos, possivelmente, estimulou a produção desse composto por SS67, nas condições de cultivo empregadas. Já na cultura mista com SS77, ocorreu uma acentuada diminuição na quantidade de afidicolina, indicando, provavelmente, que ocorreu inibição do desenvolvimento do fungo SS67 por SS77, o que estaria de acordo com o observado nos experimentos de antagonismo em placa de Petri. Essa capacidade de SS77 inibir SS67 pode estar diretamente relacionada à produção de policetídeos, como esteniferilenol (substância III) e alternariol (substância IV), que foram produzidos em maior quantidade pelo fungo SS77 na cultura líquida mista com SS67 (meio fermentativo de extrato de malte), além de outras substâncias não identificadas, que foram

detectadas na zona de inibição entre esses fungos, nos experimentos de antagonismo em meio semi-sólido.

Através da triagem biológica pôde-se observar que os extratos mais ativos contra as linhagens de células cancerígenas testadas foram os provenientes dos cultivos envolvendo o fungo SS67, e que o extrato do fungo SS84 obtido em condições estáticas é mais ativo que o obtido sob agitação (meio líquido). Esses resultados devem estar diretamente relacionados à presença do diterpeno afidicolina, que é um composto altamente citotóxico.

Os extratos de algumas culturas mistas líquidas apresentaram atividade citotóxica menor que a dos extratos dos respectivos fungos cultivados individualmente, indicando, provavelmente, que houve uma mútua inibição do desenvolvimento de ambos, resultando na menor produção de metabólitos em geral, inclusive dos ativos. Porém, a atividade citotóxica contra a linhagem celular MDAMB-435 do extrato da cultura mista de SS67 e SS77 foi consideravelmente maior que a dos extratos das culturas simples dos fungos em questão. Este aumento na atividade possivelmente está associado ao aumento na produção dos policetídeos esteniferilenol (substância **III**) e de alterperilenol (substância **IV**) pelo fungo SS77, quando cultivado com SS67.

Além disso, nos cultivos líquidos, foi possível perceber que o aumento na diversidade química, favorecida por determinados meios de cultura e formas de extração, nem sempre resulta em aumento da atividade citotóxica dos extratos brutos. A maior complexidade do extrato bruto pode ocasionar diminuição na concentração relativa dos metabólitos ativos, que deveria ser compensada pela presença de metabólitos adicionais com atividade. Assim, se há aumento na variedade química, mas os novos compostos produzidos não são ativos, é possível esperar que este extrato bruto apresente, comparativamente, uma menor atividade citotóxica que o extrato menos complexo.

Na realização dos experimentos de antagonismo em placas de Petri (meio semi-sólido), pôde-se concluir que a melhor estratégia foi estabelecer a cultura do fungo com desenvolvimento lento previamente à adição do fungo concorrente. Dessa forma foi possível verificar o efeito antagônico (formação de zonas de inibição), o que não era observado quando um fungo de crescimento rápido era adicionado simultaneamente ao de desenvolvimento lento.

Nos experimentos de antagonismo foram observadas zonas de inibição e mudanças morfológicas macroscópicas em algumas culturas mistas. Entretanto, apenas na cultura mista envolvendo os fungos SS67 e SS77 a visualização do efeito antagônico foi acompanhada pela observação de alterações no perfil químico. Nas outras culturas mistas, a ausência de alterações químicas detectáveis por CLAE-DAD pode estar relacionada à baixa concentração das substâncias ativas ou a não detectabilidade no UV. Além disso, a baixa atividade citotóxica desses extratos também pode estar relacionada às baixas concentrações de metabólitos, corroborando essa hipótese.

Nos experimentos de atividade antagônica, verificou-se que o diterpeno afidicolina (substância I), produzido por SS67, causa pouca ou nenhuma inibição dos outros fungos em meio semi-sólido, permitindo inferir que isso também pode ocorrer em meio líquido, devido à ausência de atividade antifúngica significativa. Além disso, todos os experimentos realizados permitiram concluir que o antagonismo entre os fungos SS67 e SS77, em meio semi-sólido, ocorreu pela produção de compostos difusíveis no meio de cultura, e ainda, que esses compostos foram produzidos inicialmente em baixíssimas quantidades pelo fungo SS77 a ponto de não serem detectados em CLAE-DAD (nas condições analíticas utilizadas). No entanto, o constante estímulo resultou em um acúmulo dos metabólitos secundários na zona de inibição que, então, puderam ser detectados.

Assim, a cultura mista envolvendo os fungos SS67 e SS77, tanto em meio líquido quanto em meio semi-sólido, foi a mais promissora, do ponto de vista da produção de metabólitos secundários, apresentando variações químicas em relação às culturas simples desses fungos.

O fato do estenfiperilenol (substância III), que só era detectado em cultura líquida mista (meio fermentativo de extrato de malte), também ter sido posteriormente produzido em quantidades detectáveis em cultura líquida simples, obtida em condições diferentes (meio fermentativo PDB), indica que sua produção depende de algum estímulo, desde a interação com um microrganismo até a presença de determinados nutrientes no meio de cultivo. Isso confirma que a utilização de culturas microbianas mistas representa uma importante estratégia para racionalmente induzir a produção de metabólitos secundários, sendo uma maneira alternativa aos processos laboriosos de otimização de parâmetros de cultivos, também utilizados para esse fim.

Tendo em vista que nem todos os cultivos microbianos mistos já relatados foram promissores, a utilização de culturas mistas de endofíticos é uma abordagem que provavelmente aumenta a chance de sucesso na indução da produção de metabólitos secundários, já que esses microrganismos estão em interação direta na natureza. Considerando que ambos os fungos SS67 e SS77 foram isolados dos galhos de *S. sonchifolius* (GALLO et al., 2009) e, portanto, colonizavam o mesmo tecido vegetal no momento da coleta da planta, era de se esperar que a cultura mista envolvendo esses fungos, em especial, fosse promissora. É possível que no ambiente natural exista alguma sinalização química entre ambos, eventualmente, mediada por estenfiperilenol (III) e alterperilenol (IV), envolvida no controle da colonização de SS67 por SS77.

Assim, como consequência do papel ecológico que desempenham na natureza, a produção de determinados metabólitos secundários pode ser induzida pela utilização de culturas microbianas mistas de endofíticos.

7 REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 240-242, 2001.

ADAMS, M. R.; BU'LOCK, J. D. Biosynthesis of the diterpene antibiotic, aphidicolin, by radioisotope and the carbon-13 nuclear magnetic resonance methods. **Chemical Communications**, v. 10, p. 389-391, 1975.

ALEXANDER, M. **Microbial Ecology**. New York: Wiley, 1971, p. 300-326.

ALMEIDA, F. B. R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Letters**, v. 29, n. 8, p. 1189-1193, 2007.

ANDERSEN, B.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Metabolite profiles of common *Stemphylium* species. **Mycological Research**, v. 99, n. 6, p. 672-676, 1995.

ANGELL, S.; BENCH, B. J.; WILLIAMS, H.; WATANABLE, C. M. H. Pyocyanin isolated from a marine microbial population: synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action. **Chemistry & Biology**, v. 13, p. 1349-1359, 2006.

ARAÚJO, L. W.; LIMA, S. O. A.; AZEVEDO, L. J.; MARCON, J.; SOBRAL, K. J.; LAVACA, T. P. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos, Piracicaba: ESALQ, 2002, p. 86.

ARNONE, A.; NASINI, G.; MERLINI, L.; ASSANTE, G. Secondary mould metabolites. Part 16. Stemphylltoxins, new induced perylenequinone metabolites from *Stemphylium botrysum* var. *Lactucum*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 525-530, 1986.

ASAM, S.; KONITZER, K.; SCHIEBERLE, P.; RYCHLIK, M. Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5152-5160, 2009.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-65, 2000.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.

BODE, H. B. No need to be pure: mix the culture! **Chemistry & Biology**, v. 13, p. 1245-1246, 2006.

BOKHARI, F. M.; FLANNIGAN, B. Effect of storage environment and fungal competitors on growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin production in cereals. **Dechema Monographien**, v. 133, p. 287-293, 1996.

- BORGES, W. de S. B.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.
- BROCK, T. D. **Principles of Microbial Ecology**. Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ. p. 127-134, 1966.
- BRUNDRET, K. M.; HESP, B.; DALZIEL, W. X-ray crystallographic determination of structure of antibiotic aphidicolin - tetracyclic diterpenoid containing a new ring-system. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, v. 18, p. 1027-1028, 1972.
- BUCKNALL, R. A.; MOORES, J.; SIMMS, R.; HESP, B. Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 4, p. 294-298, 1973.
- BURKHARDT, B.; PFEIFFER, E.; METZLER, M. Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells in vitro. **Mycotoxin Research**, v. 25, p.149–157, 2009.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 475–516, 2008.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- CALLERY, P.; GANNETT, P. Cancer and cancer chemotherapy. In: WILLIAMS, D. A., LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, 5. ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 924-951.
- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 20, p. 1-6, 1963.
- CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research**, v. 160, p. 75-81, 2005.
- CHIN, Y-W.; BALUNAS, M.; CHAI, H.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Natural Sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.
- CHOUDARY, D. A.; REDDY, K. R. N.; REDDY, M. S. Antifungal activity and genetic variability of *Tricoderma harzianum* isolates. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 37, p. 295-300, 2007.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004
- CLAY, K.; HOLAH, J. Plant diversity in successional fields. **Science**, v. 285, p. 1742-1744, 1999.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v. 160, p. S99-S127, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. International collaboration in drug discovery and development from natural sources. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 1923–1942, 2005.

CUETO, M.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1444-1446, 2001.

DEGENKOLB, T.; HEINZE, S.; SCHLEGEL, B.; STROBEL, G.; GRAFE, U. Formation of new lipoaminopeptides, acremostatins A, B, and C, by co-cultivation of *Acremonium* sp. Tbp-5 and *Mycogone rosea* DMS 12973. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 883-886, 2002.

EBIZUKA, Y.; HAKAMATSUKA, T.; WOO, E. R.; NOGUCHI, H.; SANKAWA, U.; SEO, S.; ITAI, A. Biosynthesis of aphidicolin and biological activity of some aphidicolane derivatives. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu**, v. 27, p. 474-480, 1985.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1121–1124, 2006.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 360-368, 2002

FEHR, M.; PAHLKE, G.; FRITZ, J.; CHRISTENSEN, M. O.; BOEGE, F.; ALTEMOELLER, M.; PODLECH, J.; MARKO, D. Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 4, p. 441-451, 2009.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; WEBSTER, J.; NOBLE, H. M.; EVANS, J. R. *Onychophora coprophila* - a new fungus producing aphidicolin. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 83, n. 1, p. 149-150, 1984.

FRANCISCA, S. F.; JOSEFA, R. C.; PILAR, S. S. M. Competitive interactions between *Fusarium sambucinum* Fuckel and *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel under in vitro conditions. **Revista iberoamericana de micologia: organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia**, v. 24, n. 1, p. 29-33, 2007.

GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 142-151, 2009.

- GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKIA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**, India: New India Publishing Agency, 2008. p. 139-168.
- GAO, K.; LIU, X.; GUO, R.; HUAI, W.; ZHANG, M. Study on antagonism of *Trichoderma* species on canker pathogen fungi of poplar. **Linye Kexue**, v. 37, n. 5, p. 82-86, 2001.
- GRAYER, R. J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 253-263, 2001.
- GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, p. 267-77, 2009.
- GULLO, V. P.; McALPINE, J.; LAM, K. S.; BAKER, D.; PETERSEN F. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 523-531, 2006.
- GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- GUTHRIE, J. L.; CASTLE, A. J. Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 961-967, 2006.
- HARVEY, A. L. Current Opinion in Chemical Biology. **Natural products as a screening resource**, v. 11, p. 480-484, 2007.
- HARVEY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.
- HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 450-452, 2009.
- HRADIL, C.; HALLOCK, Y. F.; CLARDY, J.; KENFIELD, D. S.; STROBEL, G. Phytotoxins from *alternaria cassiae*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 73-75, 1989.
- HU, D.; LIU, M.; XIA, X.; CHEN, D.; ZHAO, F.; GE, M. Preparative isolation and purification of Altertoxin I from an *Alternaria* sp. by HSCCC. **Chromatographia**, v. 67, p. 863-867, 2008.
- HUBERMAN, J. A. New views of the biochemistry of eukaryotic DNA-replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase-alpha. **Cell**, v. 23, p. 647-648, 1981.

ICHIHARA, A.; OIKAWA, H.; HAYASHI, K.; HASHIMOTO, M.; SAKAMURA, S.; SAKAI, R. 3-deoxyaphidicolin and aphidicolin analogues as phytotoxins from *Phoma betae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 1687-1689, 1984.

IKEGAMI, S.; TAGUCHI, T.; OHASHI, M.; OGURO, M.; NAGANO, H.; MANO, Y. Aphidicolin prevents mitotic cell-division by interfering with activity of DNA polymerase-alpha. **Nature**, v. 275, p. 458-460, 1978.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 288-292, 2001.

KETTERING, M.; STERNER, O.; ANKE, T. Antibiotics in the chemical communication of fungi. **Journal of Biosciences**, v. 59, p. 816-23, 2004.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J.-J.; DiTULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 446-458, 2003.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.

KUROSAWA, K.; GHIVIRIGA, I.; SAMBANDAN, T. G.; LESSARD, P. A.; BARBARA J. E.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 1126-1127, 2008.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Environment factors influence in vitro interspecific interactions between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. **Mycopathologia**, v. 146, p. 43-47, 1999.

LEMONS, A.; CLAY, K.; RUDGERS, J. A. Connecting plant-microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. **Oecologia**, v. 145, p. 595-604, 2005.

LIU, F.; CAI, X. L.; YANG, H.; XIA, X. K.; GUO, Z. Y.; YUAN, J.; LI, M. F.; SHE, Z. G.; LIN, Y. C. The bioactive metabolites of the mangrove endophytic fungus *Talaromyces* sp. ZH-154 isolated from *Kandelia candel* (L.) Druce. **Planta Medica**, v. 76, n. 2, p. 185-189, 2010.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; SOLFRIZZO, M. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 2, p. 129-140, 2009.

MASAYASU, T.; TOSHIRO, F.; YASUKO, T.; TAKANE, F. Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 11, p. 1848-1852, 1997.

MEYER, V.; STAHL, U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 68-74, 2003.

- MOSMAM, T. Rapid colorimetric assay for cellular assay growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MULLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 8, p. 450-456, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.
- NIELSEN, M.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, P. V. Colony interaction and secondary metabolite production of cheese-related fungi in dual culture. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1023-1029, 1998.
- OH, D. C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 391-393, 2009.
- OH, D. C.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5267-5273, 2005.
- OH, D. C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 515-520, 2007.
- OIKAWA, H.; ICHIHARA, A.; SAKAMURA, S. The later stage of biosynthesis of aphidicolin: accumulation of intermediates with cytochrome P-450 inhibitors. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 299-300. 1989.
- OIKAWA, H.; OHASHI, S.; ICHIHARA, A.; SAKAMURA, S. Biosynthesis of diterpenoid aphidicolin: isolation of intermediates from P-450 inhibitor treated mycelia of *Phoma betae*. **Tetrahedron**, v. 55, p. 7541-7554, 1999.
- OKUNO, T.; NATSUME, I.; SAWAI, K.; SAWAMURA, K.; FURUSAKI, A.; MATSUMOTO, T. Structure of antifungal and phytotoxic pigments produced by *Alternaria* sps. **Tetrahedron Letters**, v. 24, p. 5653-5656, 1983.
- OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, p. 175-188, 2008.
- PARK, H. B.; KWON, H. C.; LEE, C-H.; YANG, H. O. Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 248-252, 2009.
- PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, v. 437, p. 884-888, 2005.
- PATRIARCA, A.; AZCARATE, M. P.; TERMINIELLO, L.; PINTO, V. F. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 219-222, 2007.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial Ecology of Leaves**. Springer-Verlag, 1991. p. 179-197.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 19-25, 2009.

PFEIFFER, E.; ESCHBACH, S.; METZLER, M. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells in vitro. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 3, p. 152-157, 2007.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: TAFT, C. A. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, 2006. p. 51-78.

PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2006.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

PYROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. Introduction and overview. In: PYROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. **Coevolution of Fungi with Plants and Animals**. London: Academic Press, 1998. p. 1-29.

QIAO, L.-R.; YUAN, L.; GAO, J.-M.; ZHAO, P.-J.; KANG, Q.-J.; SHEN, Y.-M. Tricycloalternaree derivatives produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 340-343, 2007.

REN, L.; LI, G.; HAN, Y. C.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minutans* and its effects on production and activity of β -1,3-glucanase of this mycoparasite. **Biological Control**, v. 43, p. 1-11, 2007.

RIZZO, C. J.; SMITH, A. B. Aphidicolin synthetic studies: a stereocontrolled end game. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, v. , p. 969-979, 1991.

ROBESON, D.; STROBEL, G.; MATUSUMOTO, G. K.; FISHER, E. L.; CHEN, M. H.; CLARDY, J. Alteichin: an unusual phytotoxin from *Alternaria eichorniae*, a fungal pathogen of water hyacinth. **Experientia**, v. 40, p. 1248-50, 1984.

RODRÍGUEZ, M. A.; CABRERA, G.; GODEAS, A. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 575-86, 2006.

- ROJO, F.; FERREZ, M.; REYNOSO, M.; TORRES, A.; CHULZE, S. Effect of *Trichoderma* species on growth of *Fusarium proliferatum* and production of fumonisins, fusaproliferin and beauvericin. **Mycotoxin Research**, v. 23, p. 173-179, 2007.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, 319-343, 1998.
- SALMINEN, S. O.; RICHMOND, D. S.; GREWAL, S. K.; GREWAL, P. S.; PARWINDER, S. Influence of temperature on alkaloids levels and fall armyworm performance in endophytic tall fescue and perennial ryegrass. **Entomological Experimentalia et Applicata**, v. 115, p. 417-426, 2005.
- SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G.J. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, v. 163, p. 49-58, 2007.
- SAUNDERS, M.; KOHN, L. M. Host-synthesized secondary compounds influence the *in vitro* interactions between fungal endophytes of maize. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 136-142, 2008.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A. L.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 55, p. 315-340, 2004.
- SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753-1760, 2009.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- SCHULZ, B.; SUCHER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, v. 99, p. 1007-1015, 1995.
- SHIN, C. S.; KIM, H. J.; KIM, M. J.; JU, J. Y. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 576-581, 1998.
- SLATTERY, M.; RAJBHANDARI, I.; WESSON, K. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 90-96, 2001.
- SONNENBICHLER, J.; DIETRICH, J.; PEIPP, H. Secondary fungal metabolites and their biological activities. V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites in Basidiomycetes. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, p. 71-79, 1994.

SONNENBICHLER, J.; PEIPP, H.; DIETRICH, J. Secondary fungal metabolites and their biological activities. III. Further metabolites from dual cultures of the antagonistic Basidiomycetes *Heterobasidion annosum* and *Gloeophyllum abietinum*. **Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 374, p. 467-473, 1993.

SPADARI, S.; FOCHER, F.; KUENZLE, C.; COREY, E. J.; MEYERS, A. G.; HARDT, N.; REBUZZINI, A.; CIARROCCHO, G.; PEDRALI-NOY. *In vivo* distribution and activity of aphidicolin on dividing and quiescent cells. **Antiviral Research**, v. 5, p. 93-101, 1985.

STARRATT, A. N.; LOSCHIAVO, S. R. Production of aphidicolin by *Nigrospora sphaerica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 416-417, 1974.

STIERLE, A. C.; CARDELLINA, J. H. Phytotoxins from *alternaria alternata*, a pathogen of spotted knapweed. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 42-47, 1989.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILHO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E.; SIDHU, R. S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 17, p. 417-423, 1996.

TAN, N.; TAO, Y.; PAN, J.; WANG, S.; XU, F.; SHE, Z.; LIN, Y.; JONES, E. B. G. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus no. 2240. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, p. 296-300, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TOGASHI, K. I.; KAKEYA, H.; MORISHITA, M.; SONG, Y. X.; OSADA, H. Inhibition of human telomerase activity by alterperyleneol. **Oncology Research**, v. 10, p. 449-453, 1998.

TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SOLER, J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 185-193, 2003.

TSUJIYAMA, S. I.; MINAMI, M. Production of phenol-oxidizing enzymes in the interaction between white-rot fungi. **Mycoscience**, v. 46, p. 268-271, 2005.

VALERO, A.; FARRÉ, J. R.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARIN, S. Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and a_w . **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 160-164, 2006.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S. Preliminary study of vincristine-endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v. 35, p. 79-81, 2004.

ZERIKLY, M.; CHALLIS, G. L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **ChemBioChem**, v. 10, p. 625-633, 2009.

ZHANG, L.; GUO, B.; LI, H.; ZENG, S.; SHAO, H.; GU, S.; WEI, R. Isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic. **Zhongcaoyao**, v. 31, n. 11, p. 805-807, 2000.

ZHU, F.; LIN, Y.; DING, J.; WANG, X.; HUANG, L. Secondary metabolites of two marine-derived mangrove endophytic fungi (strain nos. 1924# and 3893#) by mixed fermentation. **Chemistry & Industry of Forest Products**, v. 27, p. 8-10, 2007.

ZHU, F.; LIN, Y. C. Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 12, p. 1426-1430, 2006.